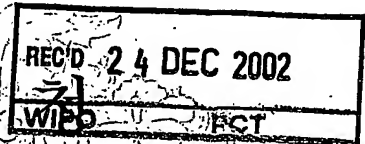


PCT/KR 02/02033

RO/KR 13.12.2002

#2



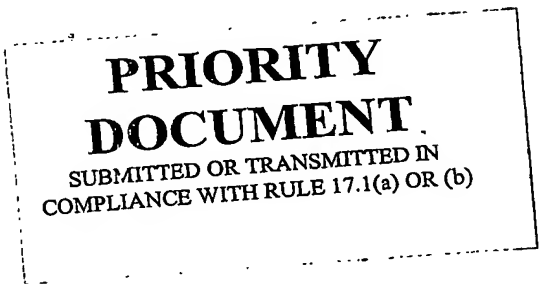
별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원번호 : 10-2002-0009647
Application Number PATENT-2002-0009647

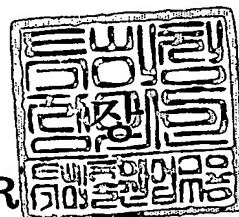
출원년월일 : 2002년 02월 22일
Date of Application FEB 22, 2002

출원인 : 한국과학기술원
Applicant(s) Korea Advanced Institute of Science and Technology



2002 년 11 월 29 일

특 허 청
COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0004
【제출일자】	2002.02.22
【국제특허분류】	C12N 15/00
【발명의 명칭】	트랜스포존과 Cre/loxP 부위 특이적 재조합 방법을 이용하는 염색체의 특정부위가 제거된 미생물 변이주 제조 방법
【발명의 영문명칭】	CONSTRUCTION OF NOVEL STRAINS CONTAINING MINIMIZING GENOME BY Tn5-COUPLED Cre/loxP EXCISION SYSTEM
【출원인】	
【명칭】	한국과학기술원
【출원인코드】	3-1998-098866-1
【대리인】	
【성명】	박장원
【대리인코드】	9-1998-000202-3
【포괄위임등록번호】	2002-009494-2
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김선창
【성명의 영문표기】	KIM, Sun Chang
【주민등록번호】	560317-1057716
【우편번호】	305-335
【주소】	대전광역시 유성구 궁동 다솔아파트 103-702
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	유병조
【성명의 영문표기】	YU, Byung Jo
【주민등록번호】	740707-1388728
【우편번호】	305-335
【주소】	대전광역시 유성구 궁동 392-3 궁동 과기원아파트 102-308
【국적】	KR
【심사청구】	청구

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 13

【서열목록의 전자파일】 첨부

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대
리인
원 (인) 박장

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 15 면 15,000 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 8 항 365,000 원

【합계】 409,000 원

【감면사유】 정부출연연구기관

【감면후 수수료】 204,500 원

【첨부서류】

1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 트랜스포존(transposon)과 Cre/loxP 부위 특이적 재조합(site-specific recombination) 방법을 이용하여, 염색체의 특정부위를 선택적으로 제거하여 새로운 미생물 변이주를 제조하는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 선별 마커(selectable marker)와 loxP 부위(loxP site)를 가진 트랜스포존과 Cre 발현백터를 이용하여 미생물 염색체의 특정부위를 제거함으로써 염색체가 축소된 새로운 미생물 변이주를 제조하는 방법에 관한 것이다.

이를 위하여, 본 발명은 (1) 선별 마커와 loxP 부위를 가진 트랜스포존을 제조하는 단계, (2) 상기 트랜스포존을 미생물 염색체의 임의의 위치에 삽입시키고 삽입된 위치를 확인하는 단계, (3) 서로 다른 선별 마커를 가진 트랜스포존을 하나의 염색체로 옮기는 단계, (4) 상기 염색체에 Cre 발현백터를 도입하여 두 loxP 부위 사이의 염색체 부위를 제거하는 단계, 및 (5) 상기 염색체 일부가 제거된 변이주에 상기 (3) 및 (4) 단계를 반복하여 점진적으로 염색체를 축소시키는 단계를 포함하여 이루어진다.

【대표도】

도 2

【색인어】

트랜스포존, Cre/loxP 부위 특이적 재조합

【명세서】

【발명의 명칭】

트랜스포존과 Cre/loxP 부위 특이적 재조합 방법을 이용하는 염색체의 특정 부위가 제거된 미생물 변이주 제조방법{CONSTRUCTION OF NOVEL STRAINS CONTAINING MINIMIZING GENOME BY Tn5-COUPLED Cre/loxP EXCISION SYSTEM}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 트랜스포존 TnKGloxP 및 TnCloxP의 제조과정 및 구조를 나타낸 것이다.

도 2는 트랜스포존 TnKGloxP 및 TnCloxP를 이용하여 염색체의 특정부위가 제거된 염색체를 갖는 대장균(*E.coli*)을 제조하는 단계를 나타낸 것이다.

도 3은 대장균 게놈 내의 TnKGloxP 및 TnCloxP의 삽입 가능한 위치를 나타낸 것이다.

도 4는 다양한 위치에 삽입된 트랜스포존 TnKGloxP와 TnCloxP를 이용하여 대장균 염색체의 특정 부위를 제거하는 방법과 제거된 염색체의 전기영동 결과를 나타낸 것이다

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<5> 본 발명은 loxP 부위를 갖는 트랜스포존(transposon), 및 Cre/loxP 부위 특이적 재조합(site-specific recombination) 방법을 이용하여 염색체의 특정부위가 제거된 미생물 변이주 및 이들을 제조하는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는, 선별 마커

(selectable marker)와 loxP 부위(loxP site)를 가진 트랜스포존과 Cre 발현벡터를 이용하여 미생물 염색체의 특정부위를 제거하여 새로운 미생물 변이주를 제조하는 방법에 관한 것이다.

- <6> 일반적으로 Cre/loxP 부위 특이적 재조합 방법을 이용하여 대장균(*E. coli*) 염색체의 특정부위를 제거하는 기술은 이미 공지되어 있지만, 종래의 방법에 의한 경우, 염색체의 특정부위를 제거하기 위해서는 매 실험마다 타겟팅 벡터(targeting vector)를 제조하고, PCR(polymerase chain reaction)을 수행하여야 하는 불편함이 있었다. 또한, 염색체 내 임의의 위치로 삽입될 수 있는 트랜스포존에 대한 기술도 이미 공지된 바가 있으나, 트랜스포존과 Cre/loxP 부위 특이적 재조합방법을 함께 사용하여 미생물 염색체를 제거하는 기술은 아직까지 보고된 바가 없다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <7> 본 발명은, 매 실험시마다 타겟팅 벡터를 제조하고 PCR을 수행하여야 했던 종래의 미생물 염색체 특정 부위 제거 방법을 개선하여, 트랜스포존과 Cre/loxP 부위 특이적 재조합 방법을 이용함으로써, 보다 간편하게 염색체의 특정부위를 제거할 수 있는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

【발명의 구성 및 작용】

- <8> 본 발명은 트랜스포존과 Cre/loxP 부위 특이적 재조합 방법을 이용하여 염색체의 특정부위가 제거된 미생물 변이주를 제조하는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 선택 마커와 loxP 부위를 가진 트랜스포존 및 상기 트랜스포존과 Cre 발현벡터를 이용하여

미생물 염색체의 특정부위를 제거하여 새로운 미생물 변이주를 제조하는 방법에 관한 것이다.

- <9> 본 발명에 따른 특정부위의 염색체 부분이 제거된 미생물 변이주의 제조방법은
- <10> (1) loxP 부위와 서로 다른 선별 마커를 가진 두 종류의 트랜스포존을 제조하는 단계,
- <11> (2) 상기 두 종류의 트랜스포존을 각각 미생물 염색체의 임의의 위치에 삽입시키고 삽입된 위치를 확인하는 단계,
- <12> (3) P1 파아지 형질도입법(P1 phage transduction)을 이용하여 상기 두 종류의 서로 다른 선별 마커를 가진 트랜스포존을 하나의 염색체로 옮기는 단계, 및
- <13> (4) 상기 염색체에 Cre 유전자를 삽입, 발현시켜 두 loxP 부위 사이의 염색체 부분을 제거하는 단계를 포함하여 이루어진다.
- <14> 이를 보다 상세히 설명하면 다음과 같다.
- <15> 상기 (1) 단계에 있어서, 상기 두 종류의 트랜스포존은 서로 다른 선별 마커를 가지고 있다. 본 발명의 구체예에서는 상기 두 종류의 트랜스포존으로서 TnKGloxP와 TnCloxP를 제조하여 사용하였다. TnKGloxP는 loxP 부위(SEQ ID NO:4)와 선별 마커로서 KmR(가나마이신 저항 유전자; kanamycin resistant gene, SEQ ID NO:5) 및 GFP(푸른 형광색 발현유전자 ; Green Fluorescent Protein, SEQ ID NO:6)를 가지고 있으며, TnCloxP는 loxP 부위(SEQ ID NO:4)와 선별 마커로서 CmR(클로람페니콜 저항 유전자; chloramphenicol resistant gene, SEQ ID NO:7)을 가지고 있다.

다. 상기 두 종류의 트랜스포존은 모두 그 양쪽 말단에 19 염기쌍으로 이루어진 전위효소 인식부위(outer end transposase recognition sequence ; OE sequence)를 가지고 있으며, 이들은 각각 SEQ ID NO:3(5'-ctgtctcttatacacatct-3') 및 이와 역상보적인 서열(5'-agatgtgtataagagacag-3')을 갖는다.

- <16> 즉, 트랜스포존 TnKGloxP는 양 말단에 19개의 염기쌍으로 이루어진 전위효소 인식부위(OE sequence)를 가지며 loxP 부위 및 선별마커로서 KmR 유전자 및 GFP 유전자를 포함하며, 트랜스포존 TnCloxP는 양 말단에 19개의 염기쌍으로 이루어진 전위효소 인식부위를 가지며, loxP 부위와 선별마커로서 CmR 유전자를 포함한다. 이 때, 상기 트랜스포존에 있어서, 본 발명에 필수적인 재조합을 위한 loxP 부위와 양 말단에 위치하는 전위효소 인식부위 및 선별을 위한 마커 부위를 제외한 부분은 트랜스포존의 제조과정에서 사용되는 벡터의 종류에 따라 다양한 염기서열과 길이를 가질 수 있다.
- <17> 상기 트랜스포존 TnKGloxP와 TnCloxP는 pTnKGloxP 벡터와 pTnCloxP 벡터로부터 PCR 반응을 통하여 얻을 수 있다(도 1 참조).
- <18> 본 발명의 한 구체예에 따르면, 상기 트랜스포존 TnKGloxP와 TnCloxP은 다음과 같은 방법으로 제조할 수 있다.
- <19> 우선, 상기 트랜스포존 TnKGloxP은,
- <20> 리가아제를 이용하여 GFP 유전자, 선상의 KmR 및 loxP 부위를 갖는 pKKloxP 벡터에 삽입하여 새로운 벡터 pKGloxP를 제조하는 단계,
- <21> 상기 pKGloxP 벡터에 제한효소를 처리하여, KmR, GFP 및 loxP 부위를 갖는 DNA 조각을 분리해 내는 단계,

- <22> 리가아제를 이용하여 상기 분리해낸 DNA 조각을 선상의 pMODTM<MCS> 벡터에 삽입하여 pTnKGloxP 벡터를 제조하는 단계, 및
- <23> 상기 pTnKGloxP 벡터를 PCR 수행시키는 단계를 포함하여 이루어지는 제조방법으로 제조할 수 있다.
- <24> 또한, 상기 트랜스포존 TnCloxP은,
- <25> CmR와 loxP 부위를 갖는 pKCloxP 벡터에 제한효소를 처리하여, CmR와 loxP 부위를 갖는 DNA 조각을 분리해 내는 단계,
- <26> 리가아제를 사용하여 상기 DNA 조각을 선상의 pMODTM<MCS> 벡터에 삽입하여 pTnCloxP 벡터를 제조하는 단계, 및
- <27> 상기 pTnCloxP 벡터를 PCR 수행시키는 단계를 포함하여 이루어지는 제조방법으로 제조할 수 있다.
- <28> 이와 같은 방법으로 제조된 트랜스포존 TnKGloxP 및 TnCloxP의 염기서열은 다음과 같으며, 이를 각각 SEQ ID NO:1과 SEQ ID NO:2에 나타내었다.

<29> TnKGloxP 염기서열

- <30> 1 attcaggctg cgcaactgtt gggaagggcg atcgggtcgg gcctcttcgc tattacgcc
- <31> 61 gctgtctctt atacacatct caaccatcat cgatgaattc gagctcggta cccgggttga
- <32> || ← OE sequences → ||
- <33> 121 actgcggatc ttgcggccgc aaaaattaaa aatgaagttt tgacgggtatc gaaccccaga
- <34> || ← KmR
- <35> 181 gtcccgtca gaagaactcg tcaagaaggc gatagaaggc gatgcgctgc gaatcgggag

<36> 241 cggcgatacc gtaaagcacg aggaagcggc cagccattc gccgccaagc tcttcagcaa
 <37> 301 tatcacgggt agccaacgct atgtcctgat agcgggccg cacaccacagc cggccacagt
 <38> 361 cgatgaatcc agaaaagcgg ccattttcca ccatgatatt cggcaagcag gcatcgccat
 <39> 421 gggtcacgac gagatcctcg ccgtcgggca tccgcgcctt gagcctggcg aacagttcgg
 <40> 481 ctggcgcgag cccctgatgc tcttcgtcca gatcatcctg atcgacaaga ccggcttcca
 <41> 541 tccgagtacg tgctcgtcgt atgcgatgtt tcgcttggtg gtcgaatggg caggtagccg
 <42> 601 gatcaagcgt atgcagccgc cgcatcgcat cagccatgat ggatactttc tcggcaggag
 <43> 661 caaggtgaga tgacaggaga tcctgccccg gcaacttcgcc caatagcagc cagtccttc
 <44> 721 ccgcttcagt gacaacgtcg agcacagctg cgcaaggaac gcccgtcgtg gccagccacg
 <45> 781 atagccgcgc tgcctcgtct tggagtcat tcagggcacc ggacaggtcg gtcttgacaa
 <46> 841 aaagaaccgg gcgcccctgc gctgacagcc ggaacacggc ggcatcagag cagccgattg
 <47> 901 tctgttgtgc ccagtcatag ccgaatagcc tctccacca agcggccgga gaacctgcgt
 <48> 961 gcaatccatc ttgttcaatc atgcgaaacg atcctcatcc tgtctcttga tccactagat
 <49> 1021 tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag
 <50> 1081 aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc tgcacgatg
 <51> KmR → ||
 <52> 1141 aattgatccg aagttcctat tctctagaaa gtataggaac ttcgaattgt cgacaagctt
 <53> 1201 gatctggctt atcgaaatta atacgactca ctataggag accggaattc attatttga
 <54> || ← GFP
 <55> 1261 gagctcatcc atgccatgtg taatcccagc agcagttaca aactcaagaa ggaccatgtg

<56> 1321 gtcacgcttt tcgttgggat ctttcgaaag ggcagattgt gtcgacaggt aatggttgc
 <57> 1381 tggtaaaagg acagggccat cgccaattgg agtatittgt tgataatggt ctgctagtgt
 <58> 1441 aacggatcca tcttcaatgt tgtggcgaat tttgaagtta gctttgattc cattcttttg
 <59> 1501 tttgtctgcc gtgatgtata cattgtgtga gttatagttg tactcgagtt tgtgtccgag
 <60> 1561 aatgtttcca tcttctttaa aatcaatacc ttttaactcg atacgattaa caagggtatc
 <61> 1621 accttcaaac ttgacttcag cagcgtctt gtagttcccg tcatctttga aagatatagt
 <62> 1681 gcgttcctgt acataacctt cgggcatggc actcttgaaa aagtcatgcc gtttcatatg
 <63> 1741 atccggataa cgggaaaagc attgaacacc ataagagaaa gtagtgacaa gtgttggcca
 <64> 1801 tggaacaggt agttttccag tagtgcaaata aaatttaagg gtaagttttc cgtatgttgc
 <65> 1861 atcaccttca ccctctccac tgacagaaaa tttgtgcccc ttaacatcac catctaattc
 <66> 1921 aacaagaatt gggacaactc cagtgaaaag ttcttctcct ttactcattt tttctaccgg
 <67> 1981 taccggggga tcctctagag tcgacctgca ggcatgcaag cttggcgtaa tcatggtcac
 <68> 2041 agctgtttcc tgtgtgaaat tggtatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa
 <69> 2101 gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaata gagtgagcta actcacatta attgcgttgc
 <70> 2161 gctcactgcc cgctttccag tcgggaaatc caagggcgaa ttcgagctcg gtaccggggc
 <71> GFP → ||
 <72> 2221 cccctcgag ggacctata *acttcgtata gcatacatta tacgaagta* tattaagggt
 <73> || ← 1oxP 부위 → ||
 <74> 2281 tccggtacct ctagagtaga cctctagagt cgacctgcag gcatgcaagc ttcagggttg
 <75> 2341 *agatgtgtat aagagacagc* tgcattaatg aatcggccaa cgcgcgggga gaggcggttt

<76> || ← OE sequences → ||

<77> 2401 gcgtattggg cgctcttccg cttcctcgct cactgac

<78> TnCloxP 염기서열

<79> 1 attcaggctg cgcaactgtt gggaagggcg atcggcgcg gcctcttcgc tattacgcca

<80> 61 gctgtctctt atacacatct caaccatcat cgatgaattc gagctcggta ccgcaaaaat

<81> || ← OE sequences → || || ← CmR

<82> 121 taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac

<83> 181 caatgcttaa tcagtgaggc accaataact gccttaaaaa aattacgccc cgccctgcca

<84> 241 ctcatcgcag tactgttgta attcattaag cattctgccg acatggaagc catcacagac

<85> 301 ggcatgatga acctgaatcg ccagcggcat cagcaccttg tcgccttgcg tataatattt

<86> 361 gcccatggtg aaaacggggg cgaagaagt gtccatattg gccacgttta aatcaaaact

<87> 421 ggtgaaactc acccagggat tggctgagac gaaaaacata ttctcaataa accctttagg

<88> 481 gaaataggcc aggttttcac cgtaacacgc cacatcttgc gaatatatgt gtagaaactg

<89> 541 ccggaaatcg tcgtggtatt cactccagag cgatgaaaac gtttcagttt gtcacatggaa

<90> 601 aacggtgtaa caagggtgaa cactatccca taccaccagc tcaccgtctt tcattgccat

<91> 661 acggaatttc ggatgagcat tcacacggcg ggcaagaatg tgaataaagg ccggataaaa

<92> 721 cttgtgctta tttttcttta cggctcttta aaaggccgta atatccagct gaacggctctg

<93> 781 gttataggta cattgagcaa ctgactgaaa tgcctcaaaa tggtctttac gatgccattg

<94> 841 ggatatatca acggtggtat atccagtgat tttttcttcc attttagctt ccttagctcc

<95> 901 tgaaaatctc gataactcaa aaaatacgcc cggtagtgat cttatttcat tatggtgaaa
 <96> 961 gttggaacct cttacgtgcc gatcaacgtc tcattttcgc caaaagttgg cccagggctt
 <97> 1021 cccggtatca acagggacac caggatttat ttattctgcg aagtgatctt ccgtcacagg
 <98> 1081 tatttattcg gcgcaaagtg cgtcgggtga tgctgccaac ttactgattt agtgatgat
 <99> 1141 ggtgtttttg aggtgctcca gtggcttctg tttctatcag catcgatgaa ttgatccgaa
 <100> CmR → ||
 <101> 1201 gttcctattc tctagaaagt ataggaactt cgaattgtcg acaagcttga tctggcttat
 <102> 1261 cgaaattaat acgactcact ataggagac cggaattcga gtcggtacc gggccccccc
 <103> 1321 tcgagggacc taataacttc *gtatagcata cattatacga agttatatta* agatcctcta
 <104> || ← 1oxP 부위 → ||
 <105> 1381 gattcgacct gcaggcatgc aagcttcagg gttgagatgt *gtataagaga cagctgcatt*
 <106> || ← OE sequences → ||
 <107> 1441 aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat tgggcgctct tccgcttctt
 <108> 1501 cgctcactga c

<109> 상기한 바와 같이, 상기 두 종류의 트랜스포존에 있어서, 1oxP 부위, OE sequence, KmR 유전자, GFP유전자 및 CmR 유전자 부위를 제외한 나머지 부위의 염기 서열이나 길이는 트랜스포존의 제조에 사용되는 벡터의 종류에 따라 달라질 수 있으며, 1oxP 부위, OE sequence, 선별 마커(KmR/GFP 또는 CmR) 부위를 모두 포함하고 그 염기서열이 보존된다면, 이를 제외한 나머지 부위는 부분적으로 하나 이상의 염기가 결실, 삽입 또는 치환되어도 트랜스포존의 기능에는 영향이 없다. 또한, 1oxP 부위는 양 말단의 전위효소 인식

부위 사이에 위치하면서 선별마커 서열 중간 또는 내부에 삽입되지 않으면 족하고, 선별 마커의 3' 방향 또는 5' 방향 중 어디에 위치하여도 무관하다.

<110> 상기 (2)단계에 있어서, 상기 두 종류의 트랜스포존, TnKGloxP와 TnCloxP에 각각 전위효소를 첨가하여 각각의 트랜스포좀(transposome)을 형성하고, 서로 다른 트랜스포존을 포함하는 트랜스포좀을 통상적인 일렉트로포레이션(electroporation) 방법을 이용하여 각기 다른 미생물 균주에 전달하여, 미생물 균주 염색체의 임의 위치에 트랜스포존을 각각 삽입시킨 후, 상기 트랜스포존이 삽입된 미생물 변이주를 선별한 후, 선별된 각 변이주 내의 트랜스포존 삽입위치를 확인한다. 이 때, 전위효소의 임의 삽입 기능은 Mg^{2+} 이온에 의하여 활성화되므로, 트랜스포좀의 형성은 Mg^{2+} 이온이 없는 조건하에서 수행하고, 미생물 균주 내에서의 트랜스포존의 임의 삽입은 Mg^{2+} 이온이 존재하는 조건하에서 수행한다. 또한, 상기 두 종류의 트랜스포존은 각각 가나마이신 저항 유전자와 클로람페니콜 저항 유전자를 포함하기 때문에 상기 두 항생제에 대하여 저항성을 가지므로, 상기 트랜스포존의 삽입 공정 수행 후, 미생물 균주를 가나마이신 배지 또는 클로람페니콜 배지에서 배양하여 각각의 트랜스포존이 삽입된 균주를 선별할 수 있다. 이 때, 하나의 트랜스포존 삽입은 서던 블러트(southern blot) 분석으로, 그리고 삽입된 트랜스포존의 위치는 임의적 PCR(arbitrary PCR)을 통하여 확인할 수 있다.

<111> 상기 (3) 단계에 있어서, 상기 트랜스포존의 위치를 확인한 미생물 변이주 중에서, 제거하고자 하는 염색체 부위의 한 쪽 끝에 임의의 한 종류의 트랜스포존이 삽입된 변이주와 다른 쪽 끝에 상기와 다른 종류의 트랜스포존이 삽입된 변이주를 각각 취하여, 이 중 하나를 공여자(donor)로 하고 다른 하나를 수여자(recipient)로 하여 통상적인 P1 파

아지 형질도입법을 통하여 상기 두 트랜스포존을 제거하고자 하는 염색체 부위의 양 끝에 위치시킨다. 이 때, loxP 부위는 같은 방향으로 위치하도록 하여야 한다.

<112> 상기 (4) 단계에 있어서, 상기 변이주 내로 pTSCre 발현벡터를 도입시킴으로써, 제거하고자 하는 염색체 부위 양 끝에 트랜스포존을 갖는 미생물 변이주 염색체 내로의 Cre 유전자 삽입을 수행한다. 이 때, pTSCre 발현벡터에 존재하는 Cre 유전자는 테트라사이클린 프로모터(Ptet)에 의하여 전사조절 되므로, 상기 pTSCre 발현벡터가 도입된 변이주를 클로로테트라사이클린이 존재하는 배지에서 배양하여 Cre 유전자를 발현시켜 Cre DNA 재조합 효소(Cre Recombinase)를 합성한다. 이 때, Cre DNA 재조합효소는 상기 두 loxP 부위를 특이적으로 절단하여 loxP를 양 끝에 포함하는 염색체 부위를 제거하고, 절단된 부분을 다시 이어주는 역할을 한다.

<113> 이에 더하여, 본 발명에 따른 제조방법은, 상기 단계에 의하여 제조된 염색체 일부가 제거된 변이주에 상기 (3) 및 (4) 단계를 반복 실행하여 염색체를 점진적으로 축소시키는 단계를 추가적으로 포함 할 수 있다. 즉, 상기 특정 부위가 제거된 변이주들 중에서 임의로 2 개를 선택하여, 상기(3) 단계와 같이 P1 파아지 형질도입법에 의하여 하나의 염색체로 융합시켜 상기 두 개의 변이주의 제거된 부위만큼 제거부위가 확장된 변이주를 제조하고, 이것과 다른 변이주와의 P1 파아지 형질도입법을 연속적으로 수행하여 염색체 제거 부위를 점점 확장시켜, 점진적으로 변이주의 염색체 크기를 축소시킨다. 상기 연속적 P1 형질도입시 원하는 균주의 효과적 선별을 위하여 P1 수여자(recipient) 역할을 하는 균주의 선별 마커를 동형 재조합(homologous recombination)하여 제거한다.

<114> 본 발명은 상기 대상 미생물로 대장균(

E. coli)을 사용하였으며, 상기 트랜스포존은 Tn5를 기초로 제조하였다. Tn5는 미생물 염색체 임의의 위치로 삽입이 가능한 것으로 보고되어 있으며(Berg, D. D., and M. M. Howe. 1989. Mobile DNA. American Society for Microbiology, Washington, D.C.), Cre DNA 재조합 효소는 두 개의 loxP 부위를 인식하여 이들 사이의 DNA 재조합 반응을 촉매하는 것으로 보고되어 있다(Abremski, K., Hoess R., and Sternberg, N. 1984. Studies on the properties of P1 site-specific recombination. Cell 32, 1301-1311). 또한, P1 파아지는 감염한 숙주 미생물 염색체의 일부를 떼어내어 다른 미생물에 전달하는 기능이 있다고 알려져 있다(Watanabe, T., Furuse, C., and Sakaizumi, S. 1968. Transduction of various R factors by phage P1 in *Escherichia coli* and by phage P22 in *Salmonella typhimurium*). 그러므로, 본 발명은 트랜스포존에 loxP 부위를 삽입하여 미생물 염색체 내의 임의의 위치로 삽입시키고, P1 파아지 형질전환법을 이용하여 2개의 loxP 부위를 동일 염색체에 같은 방향으로 위치하게 형질전환시키고 여기에 Cre 발현백터를 도입시켜 Cre DNA 재조합 효소를 발현시킴으로써, 2 개의 loxP 부위 사이의 염색체 부분이 제거된 새로운 미생물 변이주를 제조하는 기술을 개발한 것이다.

<115> 이하, 본 발명을 다음의 실시예에 의하여 보다 상세히 설명하겠으나, 본 발명이 하기의 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

<116> 실시예

<117> 실시예1

<118> 대장균 염색체의 임의의 위치에 삽입 가능한 트랜스포존 *TnKGloxP*와 *TnCloxP*의 제

조

<119> 도 1은 직선형의 트랜스포존 TnKGloxP와 TnCloxP를 나타내는 것으로, TnKGloxP는 KmR, GFP (pGFPuv, Clontech, Palo Alto, CA) 및 loxP 부위를 가지고 있으며, TnCloxP는 CmR과 loxP 부위를 가지고 있다. 상기 두 종류의 트랜스포존은 모두 그 양쪽 말단에 19 염기쌍으로 이루어진 전위효소(Epicentre technologies, Madison, WI) 인식부위를 가지고 있다. 도 2에서 알 수 있는 바와 같이, 상기 트랜스포존 TnKGloxP와 TnCloxP는 pTnKGloxP 벡터와 pTnCloxP 벡터로부터 PCR반응을 통해 얻을 수 있다.

<120> 상기 pTnKGloxP 벡터를 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 우선, PCR 반응을 통하여 얻은 GFP 유전자를 EcoRI 제한효소(New England Biolabs, Beverly, MA)를 이용하여 절단한 후, 리가아제(New England Biolabs, Beverly, MA)를 이용하여 상기 GFP 유전자를 EcoRI 제한효소에 의하여 절단시킨 선상(linear)의 KmR와 loxP 부위를 갖는 pKKloxP(Michael D. Koob, et al, 1994, In vivo excision and amplification of large segment of the Escherichia coli genome, Nucleic Acids Reserch 22(12),2392-2398) 벡터에 삽입하여 새로운 벡터를 제조한 후, 이를 pKGloxP라 명명하였다. 상기 pKGloxP 벡터를 NotI/XbaI(New England Biolabs, Beverly, MA) 제한효소와 반응시켜, KmR 유전자, GFP 유전자 및 loxP 부위를 갖는 2.2 kb 크기의 DNA 조각을 분리해 낸 후, 리가아제를 이용하여 상기 분리해낸 DNA 조각을 BamHI(New England Biolabs, Beverly, MA) 제한효소로 처리한 선상의 pMODTM<MCS> (Epicentre technologies, Madison, WI) 벡터에 삽입하여 pTnKGloxP 벡터를 제조하였다(도 1 참조).

<121> 상기 pTnCloxP 벡터는 다음과 같은 방법으로 제조하였다. CmR와 loxP 부위를 갖는 pKCloxP(Michael D. Koob, et al, 1994, In vivo excision and amplification of large segment of the Escherichia coli genome, Nucleic Acids Reserch 22(12),2392-2398) 벡

터를 NotI와 BamHI 제한효소(New England Biolabs, Beverly, MA)를 이용하여 절단하여, CmR, loxP 부위를 갖는 1.2 kb 크기의 DNA 조각을 분리해 낸 후, 리가아제를 사용하여 상기 DNA 조각을 BamHI 제한효소로 처리한 선상의 pMODTM<MCS> 벡터에 삽입하여 pTnCloxP 벡터를 제조하였다(도 1 참조).

<122> 상기 pTnKGloxP 벡터와 pTnCloxP 벡터를 PCR하여 트랜스포존 TnKGloxP와 TnCloxP를 제조하였다. 상기 PCR에 사용한 프라이머는 pMOD<MCS>FP-1(SEQ ID NO:8)과 pMOD<MCS>RP-1(SEQ ID NO:9)이며, 그 염기서열은 다음과 같다.

<123> pMOD<MCS>FP-1 : 5' ATTTCAGGCTGCGCAACTGT-3'

<124> pMOD<MCS>RP-1 : 5' -TCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAG-3'

<125> 실시예 2

<126> 트랜스포존 TnKGloxP와 TnCloxP를 대장균 염색체의 임의의 위치에 삽입시킨 두 종류의 대장균 변이주 라이브러리의 제조 및 삽입된 위치 확인

<127> 500 ng의 TnKGloxP와 500 ng의 TnCloxP를 각각 10 μ l의 Tn5 전위효소(1 unit / μ l)와 DDW(Double Distilled Water)와 반응시켜 총 20 μ l로 만든 다음, 상온(25 $^{\circ}$ C)에서 30 분동안 반응시켜 각각의 트랜스포좀을 형성시켰다. 이 때, 전위효소의 임의 삽입기능을 억제하기 위하여, 상기 반응은 Mg^{2+} 이온이 없는 상황에서 진행시켰다. 그리고 나서, Mg^{2+} 이온이 존재하는 반응 조건하에서 통상적인 일렉트로포레이션 방법[Bio-RAD, Bacterial electro-transformation and Plus Controller Instruction Manual, Cat.No 165-2098 ; Thompson, JR, et al. An improved protocol for the preparation of yeast cells for transformation by electroporation. Yeast 14, 565-571 (1998) ; Grant, SG,

et al. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4645-4649 (1990)]을 통하여 1 μ l의 트랜스포좀을 대장균 MG1655 균주(서울대 생명과학부 노정혜교수)내로 전달시켰다. 이러한 균을 배양하기 위해 LB배지(tryptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%)를 사용하였고, 상기 배지내에 소량의 Mg^{2+} 이온이 존재하게 하였다. 따라서, 트랜스포좀은 대장균 균주의 세포 내에서 Mg^{2+} 이온에 의하여 임의 삽입기능이 활성화되어 대장균 염색체의 임의의 위치로 삽입될 수 있게 된다. 상기 두 종류의 트랜스포존이 삽입된 각각의 대장균 변이주는 트랜스포존에 존재하는 KmR 또는 CmR 유전자 때문에 가나마이신 저항성 또는 클로람페니콜 저항성을 가지므로, 가나마이신 배지 또는 클로람페니콜 배지에서 선별하였다. 이 때, 대장균 MG1655 균주 염색체 내로 삽입된 각각의 트랜스포존을 서던 블러트(Southern blot) 분석을 통하여 확인하였다. 서던 블러트 분석의 조건은 다음과 같다. 트랜스포존이 삽입된 대장균 변이주의 염색체 DNA를 분리하여 이를 ClaI(New England Biolabs, Beverly, MA) 제한효소로 반응시켜 절단시킨 후, 1% 아가로스 겔에서 전기영동을 수행하였다. 이 때, 아가로스 겔의 DNA를 하이본드 N⁺ 멤브레인(Hybond N⁺ membrane, Amersham)으로 전이시키고, 전이된 DNA는 방사선동위원소 ³²P로 표지된 KmR 또는 CmR 유전자를 프로브로 사용하여 블러팅 하였다. 트랜스포존의 삽입위치는 임의적 PCR(arbitrary PCR)을 통해 확인하였다(Caetano-Annoles, G. 1993. Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. *PCR Methods Appl.*, 3, 85-92.).

<128> 트랜스포존이 삽입된 위치 주위의 DNA는 트랜스포존 내의 Tn5 삽입서열(insertion sequence)에 특이적인 프라이머와 트랜스포존 바깥쪽의 염색체 DNA에 임의로 결합하는

프라이머를 사용하여 증폭시켰다. 상기 임의적 PCR은 두 단계로 구성된다. 첫 번째 단계에서 트랜스포존 특이적인 프라이머 Tn5Ext(5' AGCATACATTATACGAAGTTATATTAAG-3', (주)제노텍에서 합성)를 이용하여 트랜스포존의 끝부분과 그 바깥쪽 서열을 포함하는 부위의 단일가닥 DNA를 합성하고, 이어서, 불특정 부위에 결합하는 프라이머 Arb1(5' TTGAGCGATAGACGTACGATNNNNNNNNNGATAT-3', (주)제노텍에서 합성)를 상기 합성된 단일가닥 DNA의 불특정 부위에 결합시켜 이중가닥의 DNA로 합성하였다. 두 번째 단계에서 트랜스포존 특이적인 프라이머 Tn5Int와 Arb1의 3' 말단의 25개의 서열과 동일한 프라이머 Arb2 (5' TTGAGCGATAGACGTACGAT-3', (주)제노텍에서 합성)를 이용하여 상기 합성한 이중가닥 DNA를 대량으로 증폭시켰다. 증폭된 DNA는 퀴아릭 스피ن PCR 정제 키트(Qiaquick spin PCR purification kit, Quiagen)을 이용하여 아가로스 겔로부터 분리하였고, 프라이머 Tn5Int(5' TCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTCA-3', (주)제노텍에서 합성)를 이용하여 상기 분리된 DNA의 염기서열 분석을 실행하였으며, 그 결과를 BLAST 프로그램을 이용하여 유전자 은행 DNA 서열(Gene Bank DNA sequence)과 비교하여 삽입위치를 확인하였다. 상기 방법에 의하여 확인된 TnKGloxP 및 TnCloxP 의 삽입위치를 도 3에 나타내었다.

<129> 실시예 3

<130> P1 파아지 형질도입법을 이용한 두 종류의 트랜스포존을 가지는 대장균 변이주의 제조

<131> 실시예 2에 따라 제조된 TnKGloxP 변이주 라이브러리와 TnCloxP 변이주 라이브러리 중에서, 제거하고자 하는 염색체 특정부위 한 쪽 끝부분과 다른 쪽 끝 부분에 각기 다른 트랜스포존이 존재하도록 변이주를 선별하여, P1 파아지 형질도입법을 이용하여 두 종류의 트랜스포존을 하나의 염색체 상에 제거하고자 하는 특정부위 양쪽에 위치하도록 도입

시켰다. 이 때, loxP 부위는 같은 방향으로 위치하도록 하였으며, P1 파아지 형질도입법은 이미 알려진 통상적인 실험방법에 따라 수행하였다(Miller, J.H., editors, 1992, A short Course in Bacterial Genetics; A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria, New York: Cold Spring Harbor).

<132> 실시예 4

<133> *pTSCre* 발현백터를 도입시킴으로써 *Cre* DNA 재조합 효소를 발현시켜 결실변이를 갖는 대장균 변이주의 제조

<134> 실시예 3에 따라 제조된 TnKGloxP와 TnCloxP을 제거할 부위 양 끝에 갖는 대장균 변이주에 *Cre*를 발현시키는 *pTSCre* 발현백터(Yoon YG, et al, 1998, *Cre/loxP*-mediated excision and amplification of the Escherichia coli genome, Gene 14, 89-95)를 도입시켰다. *pTSCre* 발현백터에 존재하는 *Cre* 유전자는 테트라사이클린 프로모터(Ptet)에 의해 전사 조절 되므로, 크로로테트라사이클린이 존재하는 배지에서 42℃로 배양하여 *Cre* DNA 재조합 효소를 발현시켰다. *Cre* DNA 재조합 효소의 발현결과 얻어지는 염색체 결실 변이를 가지는 대장균 변이주는 PCR을 통해 확인하였다.

<135> 본 실시예3 및 4에서, b0532 위치에 TnKGloxP가 삽입된 변이주와 b0619 위치에 TnCloxP가 삽입된 변이주, b2011 위치에 TnKGloxP가 삽입된 변이주와 b2073 위치에 TnCloxP가 삽입된 변이주, b2829 위치에 TnKGloxP가 삽입된 변이주와 b2890 위치에 TnCloxP가 삽입된 변이주 및 b4271 위치에 TnKGloxP가 삽입된 변이주와 b4326 위치에 TnCloxP가 삽입된 변이주를 사용하여, 이들을 각각 P1 형질도입시키고 *Cre* 유전자를 발현시켰으며, 그 결과를 각각 도 4의 A, B, C 및 D에 나타내었다.

<136> 실시예 5

<137> P1 파아지 형질도입방법을 반복 수행하여 변이주의 염색체 결실부위가 확장된 변이체 제조

<138> 상기 염색체 특정부위가 제거된 각각의 대장균 변이주의 제거된 염색체의 부위를 상기 실시예 3 및 실시예 4와 동일한 방법으로 P1 파아지의 형질도입법을 이용하여 확장시켰다. 우선, 염색체가 제거된 변이주 중 2 개의 변이주를 선택하여 하나를 P1 파아지의 공여자로, 다른 하나를 P1 파아지 용해물(lysate)의 수여자로 하여 P1 파아지 형질도입법을 수행하여 상기 두 변이주의 염색체 제거 부분이 모두 제거된 염색체를 갖는 변이주를 제조한 후, 이를 다시 P1 파아지의 수여자로 하고, 이미 만들어진 다른 염색체 부분이 제거된 변이주를 공여자로하여 연속해서 P1 파아지 형질도입법을 수행함으로써, 하나의 염색체에서 다른 변이주의 염색체의 제거부위를 계속적으로 제거시켜 점진적으로 염색체를 축소시켰다. 이 때, 연속적인 P1 파아지의 형질전환시 원하는 균주의 효과적인 선별을 위하여 동형 재조합(homologous recombination)을 이용하여 P1 파아지 수여자의 선별 마커를 제거한다.

【발명의 효과】

<139> 상술한 바와 같이, 본 발명은 트랜스포존과 Cre/loxP 부위 특이적 재조합 방법을 이용한 염색체의 특정부위를 제거한 대장균 변이주의 제조방법으로 보다 효율적으로 다양한 부위의 대장균 염색체를 선택적으로 제거하여 특정 부분 염색체가 제거된 대장균 변이주의 라이브러리를 획득할 수 있고, 이들을 가지고 P1 파아지 형질전환법을 계속적으로 수행하면 점진적으로 염색체를 축소시켜 선택적으로 염색체가 축소된 다양한 대장균 변이주들을 창조해낼 수 있는 효과가 있다. 이러한 방법으로 대장균내 성장에 불필요한

유전자를 제거함으로써, 보다 유전적으로 간단한 염색체를 가지는 대장균 변이주를 구축하여, 이를 여러 가지 유전체 기능연구에 사용할 수 있다. 또한, 성장에 불필요한 유전자들을 제거함으로써 빠른 성장을 보이는 대장균 변이주를 선별하여 산업용 인공균주로서 사용할 수도 있다. 또한, 대장균에서뿐만 아니라 다른 미생물에서도 본 발명을 적용함으로써, 염색체가 선택적으로 축소된 다양한 미생물 변이주들을 창조해낼 수 있는 효과가 있다. 또한, 본 발명에 따른 방법에 의하여 제조된 축소된 미생물 염색체에 외래의 새로운 대사에 관련 유전자를 모아 카세트를 만들어 도입하여 여러 가지 유용한 기능들을 가지게 되는 새로운 생물체를 만드는데 적용 될 수도 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

한 쪽 말단에 SEQ ID NO:3의 서열을 갖는 전위효소 인식부위를 갖고 다른 쪽 말단에 이와 역상보적인 서열을 갖는 전위효소 인식부위를 가지며, SEQ ID NO:4로 표현되는 loxP 부위와 SEQ ID NO:5로 표현되는 KmR 유전자 및 SEQ ID NO:6으로 표현되는 GFP 유전자를 포함하는 트랜스포존 TnKGloxP.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, SEQ ID NO:1의 염기서열을 포함하는 트랜스포존 TnKGloxP.

【청구항 3】

한 쪽 말단에 SEQ ID NO:3의 서열을 갖는 전위효소 인식부위를 갖고 다른 쪽 말단에 이와 역상보적인 서열을 갖는 전위효소 인식부위를 가지며, SEQ ID NO:4로 표현되는 loxP 부위와 SEQ ID NO:7로 표현되는 CmR 유전자를 포함하는 트랜스포존 TnCloxP.

【청구항 4】

제 3 항에 있어서, SEQ ID NO:2의 염기서열을 포함하는 트랜스포존 TnCloxP.

【청구항 5】

전위효소 인식부위, loxP 부위 및 서로 다른 선별 마커를 갖는 두 종류의 트랜스포존을 제조하는 단계,

상기 두 종류의 트랜스포존을 각각 미생물 염색체의 임의의 위치에 삽입하고 삽입된 위치를 확인하는 단계,

P1 파아지 형질도입법(P1 phage transduction)을 이용하여 상기 두 종류의 서로 다른 선별마커를 가진 트랜스포존을 하나의 염색체 상에 위치시키는 단계, 및

상기 염색체에 Cre 유전자를 삽입하고 이를 발현시켜 두 개의 loxP 부위 사이의 염색체 부분을 제거하는 단계를 포함하는, 특정 염색체 부위가 제거된 미생물 변이주 제조 방법.

【청구항 6】

제 3 항에 있어서, 상기 두 종류의 트랜스포존이 제 1 항 또는 제 2 항에 따른 트랜스포존 TnKGloxP 및 제 3 항 또는 제 4 항에 따른 트랜스포존 TnCloxP인 미생물 변이주 제조방법.

【청구항 7】

제 5 항에 있어서, 리가아제를 이용하여 GFP 유전자를 선상의 KmR 및 loxP 부위를 갖는 pKKloxP 벡터에 삽입하여 새로운 벡터 pKGloxP를 제조하는 단계, 상기 pKGloxP 벡터에 제한효소를 처리하여, KmR, GFP 및 loxP 부위를 갖는 DNA 조각을 분리해 내는 단계, 리가아제를 이용하여 상기 분리해낸 DNA 조각을 선상의 pMODTM<MCS> 벡터에 삽입하여 pTnKGloxP 벡터를 제조하는 단계, 및 상기 pTnKGloxP 벡터를 PCR 수행시키는 단계를 포함하는 방법에 의하여 SEQ ID NO:1의 염기서열을 포함하는 트랜스포존 TnKGloxP를 제조하고,

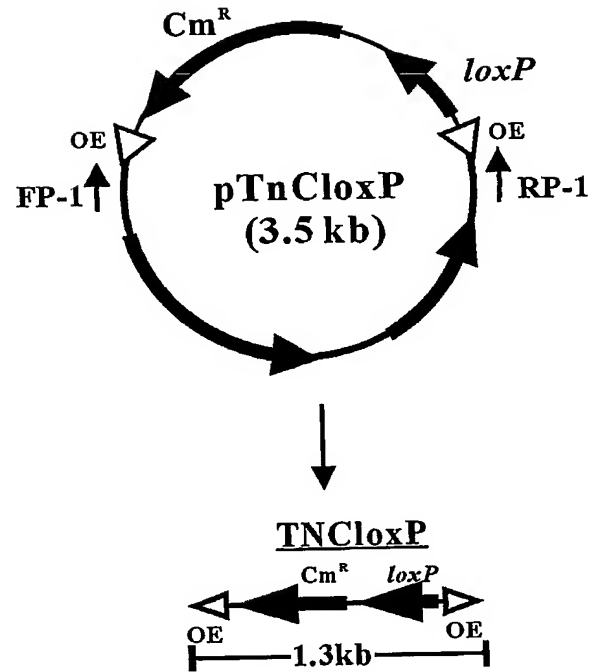
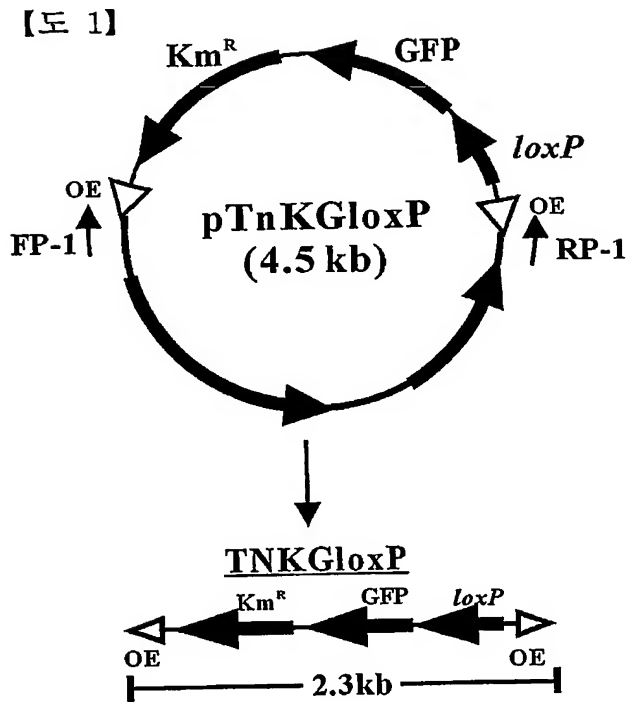
CmR와 loxP 부위를 갖는 pKCloxP 벡터에 제한효소를 처리하여, CmR와 loxP 부위를 갖는 DNA 조각을 분리해 내는 단계, 리가아제를 사용하여 상기 DNA 조각을

선상의 pMODTM<MCS> 벡터에 삽입하여 pTnCloxP 벡터를 제조하는 단계, 및 상기 pTnCloxP 벡터를 PCR 수행시키는 단계를 포함하는 방법에 의하여 SEQ ID NO:2의 염기서열을 포함하는 트랜스포존 TnCloxP을 제조하여 수행하는 미생물 변이주 제조방법.

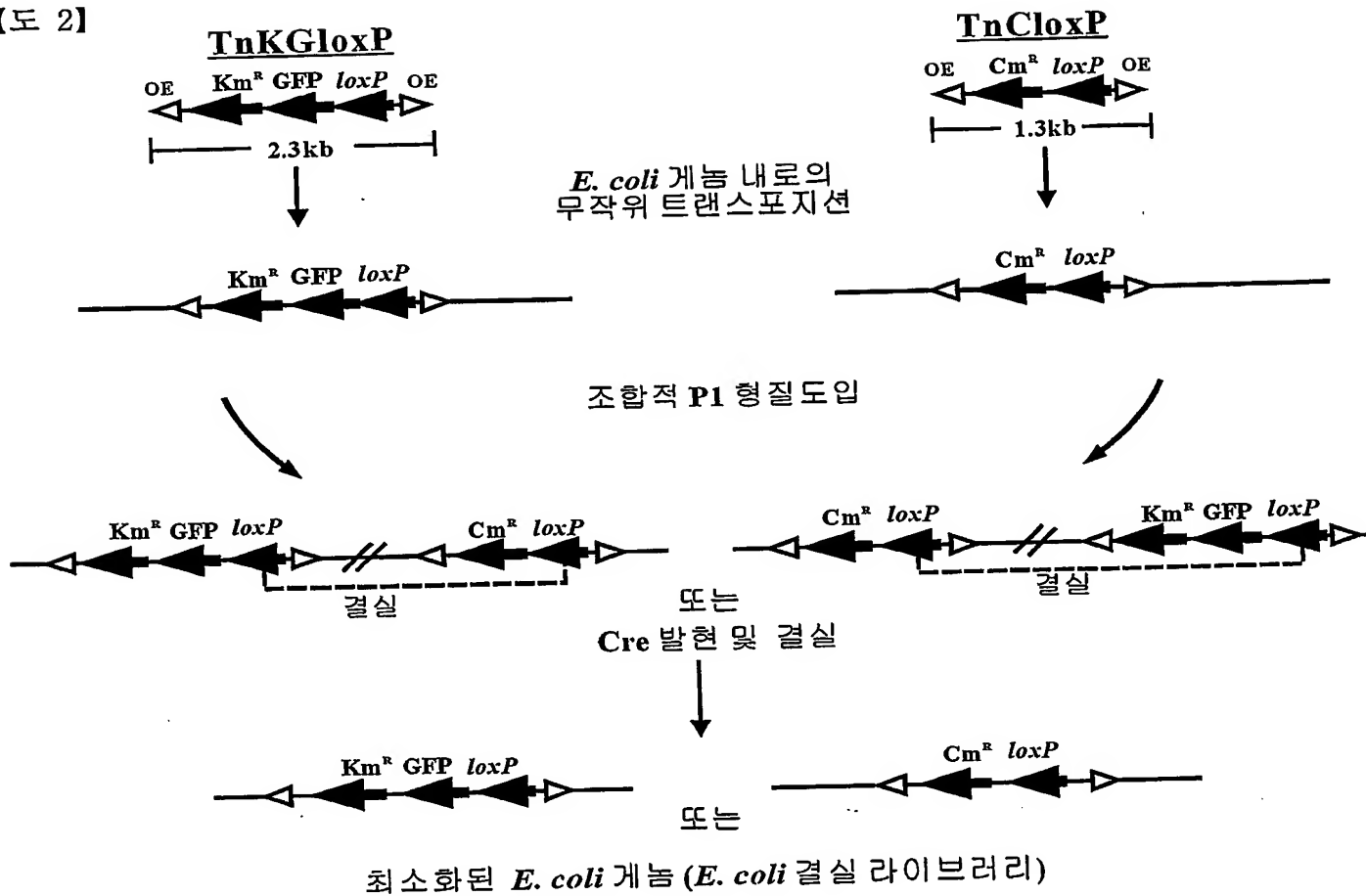
【청구항 8】

제 5 항 또는 제 7 항에 있어서, 상기 염색체가 제거된 변이주 중에서 2 개의 변이주를 선택하여 하나를 공여자(donor)로, 다른 하나를 수여자(recipient)로 하여 P1 파아지 형질도입법을 수행하여, 상기 두 변이주의 염색체 제거 부분이 모두 제거된 염색체를 갖는 변이주를 제조한 후, 이를 다시 P1 파아지의 수여자로 하고 이미 만들어진 다른 염색체 부분이 제거된 변이주를 공여자로하여 연속적으로 P1 파아지 형질도입법을 수행함으로써, 하나의 염색체에서 다른 변이주의 염색체의 제거부위가 계속적으로 제거되어 점진적으로 염색체를 축소시키는 단계를 추가적으로 포함하는 미생물 변이주 제조방법.

【도면】

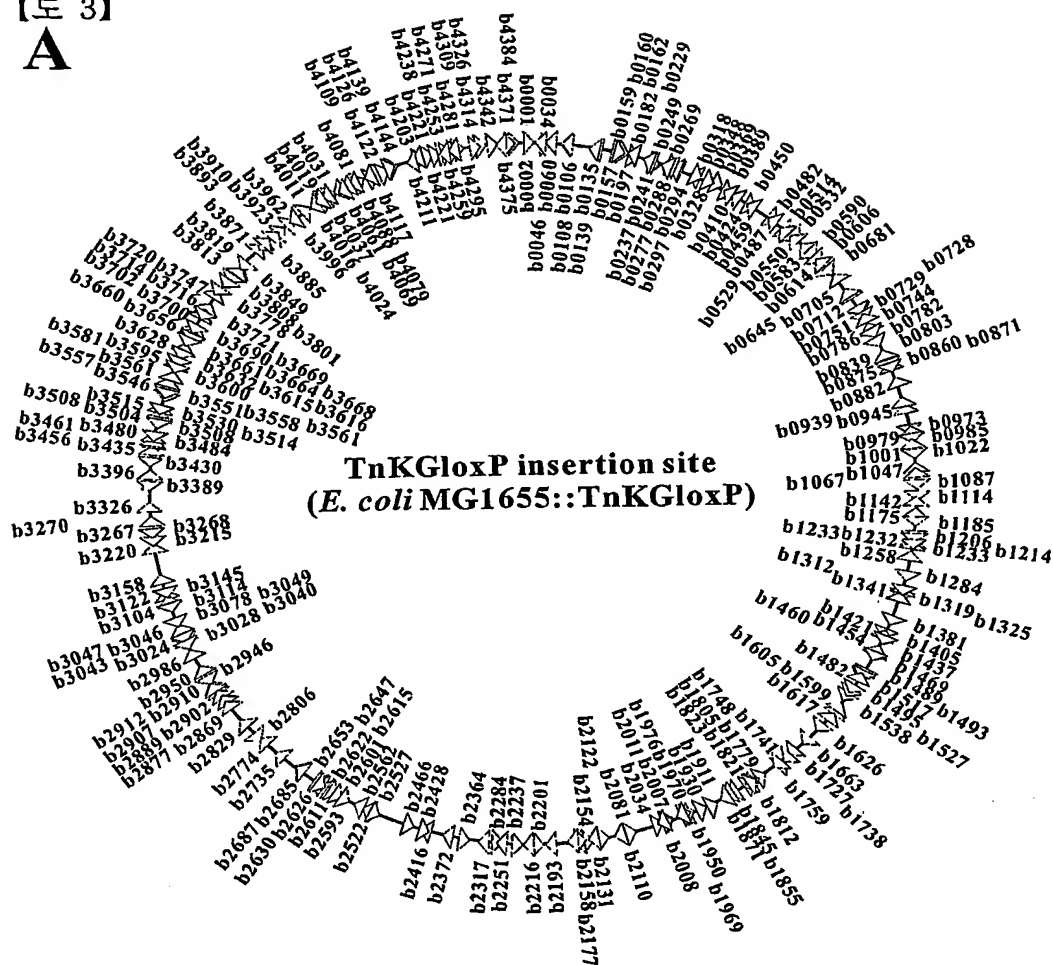


【도 2】

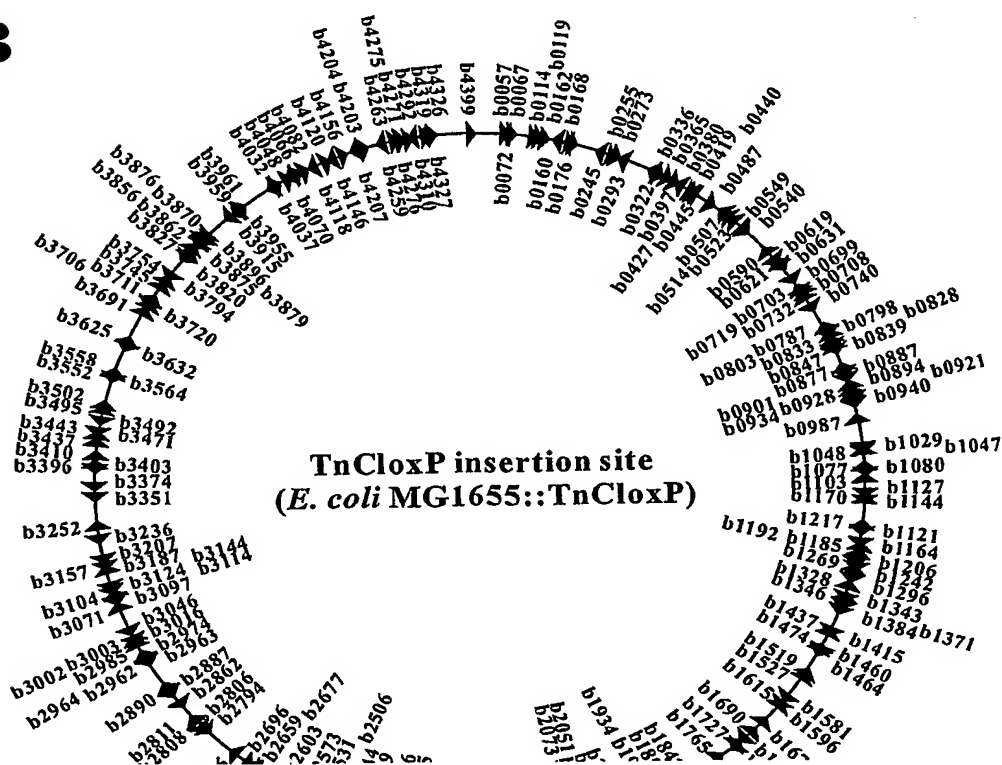


【도 3】

A



B

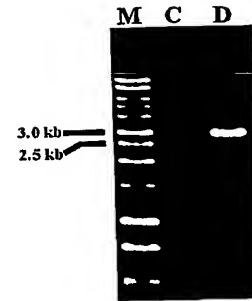
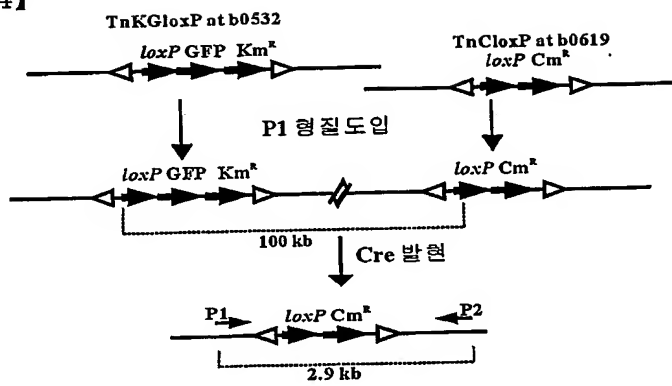


1020020009647

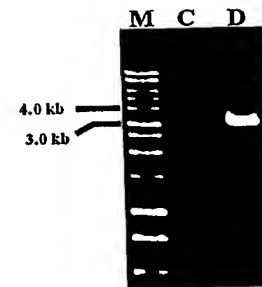
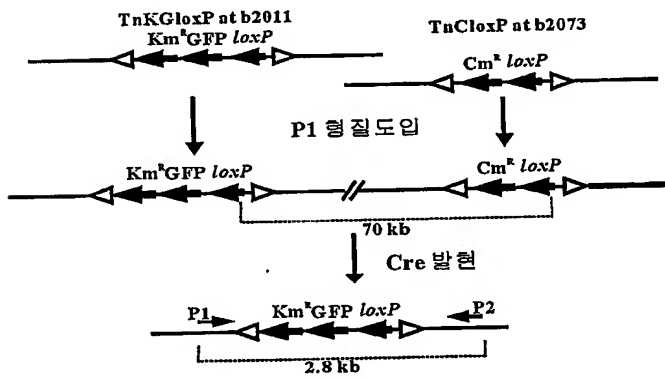
출력 일자: 2002/11/30

【도 4】

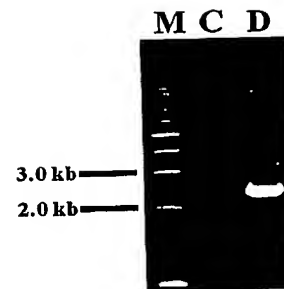
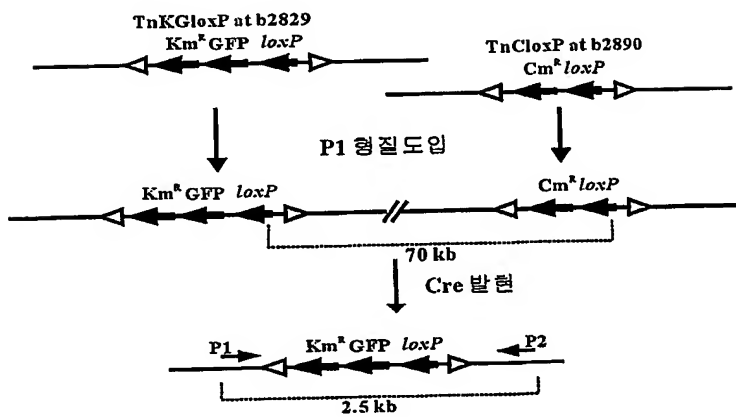
A.



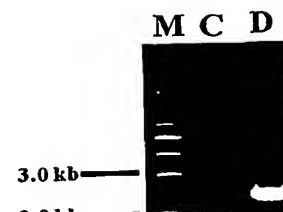
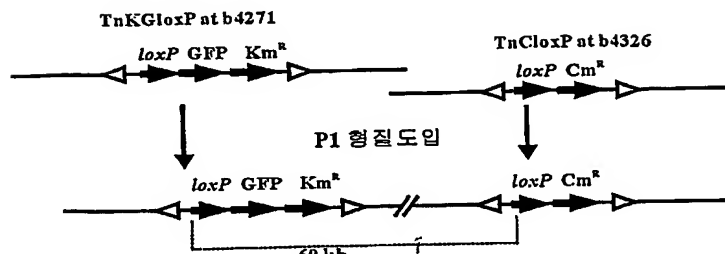
B.



C.



D.



【서열목록】

<110> Korea Advanced institute of Science and Technology <120> CONSTRUCTION OF
 NOVEL STRAINS CONTAINING MINIMIZING GENOME BY Tn5-COUPLED Cre/loxP EXCISION
 SYSTEM <160> 13 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 2437 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence <220> <223> TnKGloxP <400> 1 attcaggctg
 cgcaactggt gggaagggcg atcggtgcgg gcctcttcgc tattacgcca 60 gctgtctctt
 atacacatct caaccatcat cgatgaattc gagctcggta cccgggttga 120 actgcggatc
 ttgcggccgc aaaaattaaa aatgaagttt tgacggtatc gaaccccaga 180 gtcccgtca
 gaagaactcg tcaagaaggc gatagaaggc gatgcgctgc gaatcgggag 240 cggcgatacc
 gtaaagcacg aggaagcggc cagcccattc gccgccaagc tcttcagcaa 300 tatcacgggt
 agccaacgct atgtcctgat agcggtcgc caccaccagc cggccacagt 360 cgatgaatcc
 agaaaagcgg ccattttcca ccatgatatt cggcaagcag gcatcgccat 420 gggtcacgac
 gagatcctcg ccgtcgggca tccgcgcctt gagcctggcg aacagttcgg 480 ctggcgcgag
 cccctgatgc tcttcgtcca gatcatcctg atcgacaaga ccggcttcca 540 tccgagtacg
 tgctcgctcg atgcgatgtt tcgcttggtg gtcgaatggg caggtagccg 600 gatcaagcgt
 atgcagccgc cgcattgcat cagccatgat ggatactttc tcggcaggag 660 caaggtgaga
 tgacaggaga tcctgccccg gcacttcgcc caatagcagc cagtcccttc 720 ccgcttcagt
 gacaacgtcg agcacagctg cgcaaggaac gcccgtcgtg gccagccacg 780 atagccgcgc
 tgctcgtct tggagttcat tcagggcacc ggacaggtcg gtcttgacaa 840 aaagaaccgg
 gcgcccctgc gctgacagcc ggaacacggc ggcatcagag cagccgattg 900 tctgtttgtg

ccagtcatag ccgaatagcc tctccacca agcggccgga gaacctgcgt	960 gcaatccatc
ttgttcaatc atgcgaaacg atcctcatcc tgtctcttga tccactagat	1020 tattgaagca
tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatitga atgtatttag	1080 aaaaataaac
aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc tgcacgatg	1140 aattgatccg
aagttcctat tctctagaaa gatataggaac ttcgaattgt cgacaagctt	1200 gatctggctt
atcgaaatta atacgactca ctataggag accggaattc attatttgta	1260 gagctcatcc
atgccatgtg taatcccagc agcagttaca aactcaagaa ggaccatgtg	1320 gtcacgcttt
tcgttgggat ctttcgaaag ggcagattgt gtcgacaggt aatggttgc	1380 tggtaaaagg
acagggccat cgccaattgg agtatititgt tgataatggg ctgctagtgt	1440 aacggatcca
tcttcaatgt tgtggcgaat tttgaagtta gctttgattc cattcttttg	1500 tttgtctgcc
gtgatgtata cattgtgtga gttatagttg tactcgagtt tgtgtccgag	1560 aatgtttcca
tcttctttaa aatcaatacc ttttaactcg atacgattaa caagggtatc	1620 accttcaaac
ttgacttcag cacgcgtctt gtagttcccg tcacttttga aagatatagt	1680 gcgttcctgt
acataacctt cgggcatggc actcttgaaa aagtcatgcc gtttcatatg	1740 atccggataa
cgggaaaagc attgaacacc ataagagaaa gtagtgacaa gtgttgcca	1800 tggaacaggt
agttttccag tagtgcaaat aaatttaagg gtaagttttc cgtatgttgc	1860 atcaccttca
ccctctccac tgacagaaaa tttgtgcca ttaacatcac catctaattc	1920 aacaagaatt
gggacaactc cagtgaaaag ttcttctcct ttactcattt tttctaccgg	1980 taccggggga
tcctctagag tcgacctgca ggcatgcaag cttggcgtaa tcatggcat	2040 agctgtttcc
tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa	2100 gcataaagtg
taaagcctgg ggtgcctaata gtagtgagcta actcacatta attgcgttgc	2160 gctcactgcc

cgctttccag tcgggaaatc caagggcgaa ttcgagctcg gtaccgggcc 2220 cccctcgag
 ggacctata acttcgtata gcataatta tacgaagtta tattaagggt 2280 tccggtacct
 ctagagtaga cctctagagt cgacctgcag gcatgcaagc ttcagggttg 2340 agatgtgtat
 aagagacagc tgcattaatg aatcggccaa cgcgcgggga gaggcggttt 2400 gcgtattggg
 cgctcttccg cttcctcgct cactgac 2437 <210> 2 <211>

1511 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> TnCloxP <400> 2

attcaggctg cgcaactgtt gggaagggcg atcgggtcgg gcctcttcgc tattacgcca 60
 gctgtctctt atacacatct caaccatcat cgatgaattc gagctcggtta ccgcaaaaat 120
 taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac 180
 caatgcttaa tcagtggagc accaataact gccttaaaaa aattacgccc cgccctgcc 240
 ctcatcgag tactgttgta attcattaag cattctgccg acatggaagc catcacagac 300
 ggcatgatga acctgaatcg ccagcggcat cagcaccttg tcgccttgcg tataatattt 360
 gcccatggtg aaaacggggg cgaagaagtt gtccatattg gccacgttta aatcaaaact 420
 ggtgaaactc acccagggat tggctgagac gaaaaacata ttctcaataa accctttagg 480
 gaaataggcc aggttttcac cgtaacacgc cacatcttgc gaatatatgt gtagaaactg 540
 ccggaatcg tcgtggtatt cactccagag cgatgaaaac gtttcagttt gctcatggaa 600
 aacggtgtaa caagggtgaa cactatccca tatcaccagc tcaccgtctt tcattgccat 660
 acggaatttc ggatgagcat tcacaggcg ggcaagaatg tgaataaagg ccggataaaa 720
 cttgtgctta tttttcttta cggctcttaa aaaggccgta atatccagct gaacggtctg 780
 gttataggta catigagcaa ctgactgaaa tgcctcaaaa tgttctttac gatgccattg 840
 ggatatatca acggtggtat atccagtgat tttttctcc attttagctt ccttagctcc 900

tgaaaatctc gataactcaa aaaatacgcc cggtagtgat cttatttcat tatggtgaaa 960
 gttggaacct cttacgtgcc gatcaacgtc tcattttcgc caaaagttgg cccagggctt 1020
 cccggtatca acagggacac caggatttat ttattctgcg aagtgatctt ccgtcacagg 1080
 tatttattcg gcgcaaagtg cgtcgggtga tgctgccaac ttactgattt agtgtatgat 1140
 ggtgtttttg aggtgctcca gtggcttctg tttctatcag catcgatgaa ttgatccgaa 1200
 gttcctattc tctagaaagt ataggaactt cgaattgtcg acaagcttga tctggcttat 1260
 cgaaattaat acgactcact ataggagac cggaattcga gctcgggtacc gggccccccc 1320
 tcgagggacc taataacttc gtatagcata cattatacga agttatatta agatcctcta 1380
 gagtcgacct gcaggcatgc aagcttcagg gttgagatgt gtataagaga cagctgcatt 1440
 aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat tgggcgctct tccgcttcct 1500
 cgctcactga c 1511 <210>
 3 <211> 19 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> OE sequence
 <400> 3 ctgtctctta tacacatct
 19 <210> 4 <211> 34 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 loxP site <400> 4 ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttat
 34 <210> 5 <211> 996 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 KmR gene <400> 5 gcaaaaatta aaaatgaagt ttgacggta tcgaaccca gagtcccgt
 cagaagaact 60 cgtcaagaag gcgatagaag gcgatgctg gcaatcggg agcggcgata
 ccgtaaagca 120 cgaggaagcg gtcagcccat tcgccgcaa gctcttcagc aatatcacgg
 gtagccaacg 180 ctatgtcctg atagcgtcc gccacacca gccggccaca gtcgatgaat
 ccagaaaagc 240 ggccattttc caccatgata ttcggcaagc aggcacgccc atgggtcacg

acgagatcct 300 cgccgtcggg catccgcgcc ttgagcctgg cgaacagttc ggctggcgcg
 agcccctgat 360 gctcttcgtc cagatcatcc tgatcgacaa gaccggcttc catccgagta
 cgtgctcgct 420 cgatgcgatg tttcgcttgg tggtcgaatg ggcaggtagc cgatcaagc
 gtatgcagcc 480 gccgcattgc atcagccatg atggatactt tctcggcagg agcaaggtga
 gatgacagga 540 gatcctgccc cggcacttcg cccaatagca gccagtcctt tcccgttca
 gtgacaacgt 600 cgagcacagc tgcgcaagga acgcccgtcg tggccagcca cgatagccgc
 gctgcctcgt 660 cttggagttc attcagggca ccggacaggt cggctcttgac aaaaagaacc
 gggcgcccct 720 gcgctgacag ccggaacacg gcggcatcag agcagccgat tgtctgttgt
 gccagtcatt 780 agccgaatag cctctccacc caagcggccg gagaacctgc gtgcaatcca
 tcttgttcaa 840 tcatgcgaaa cgatcctcat cctgtctctt gatccactag attattgaag
 catttatcag 900 ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa
 acaaataggg 960 gttccgcgca catttccccg aaaagtgcc cctgca
 996 <210> 6 <211> 947 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 GFP gene <400> 6 attatttgta gagtcatcc atgcatgtg taatcccagc agcagttaca
 aactcaagaa 60 ggaccatgtg gtcacgcttt tcgttgggat ctttcgaaag ggcagattgt
 gtcgacaggt 120 aatggttgtc tggtaaaagg acagggccat cgccaattgg agtattttgt
 tgataatggt 180 ctgctagttg aacggatcca tcttcaatgt tgtggcgaat tttgaagtta
 gctttgattc 240 cattcttttg tttgtctgcc gtgatgtata cattgtgtga gttatagttg
 tactcgagtt 300 tgtgtccgag aatgtttcca tcttctttaa aatcaatacc ttttaactcg
 atacgattaa 360 caagggtatc accttcaaac ttgacttcag cacgcgtctt gtagttcccc
 tcatctttga 420 aagatatagt gcgttcctgt acataacctt cgggcatggc actcttgaaa

aagtcatgcc	480	gtttcatatg atccggataa cgggaaaagc attgaacacc ataagagaaa
gtagtgacaa	540	gtgttggcca tggaacaggt agttttccag tagtgcaa ataaatttaagg
gtaagttttc	600	cgtatgttgc atcaccttca ccctctccac tgacagaaaa tttgtgcccc
ttaacatcac	660	catctaattc aacaagaatt gggacaactc cagtgaaaag tttcttctct
ttactcattt	720	tttctaccgg taccggggga tcctctagag tcgacctgca ggcatgcaag
cttggcgtaa	780	tcatgggtcat agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc
acacaacata	840	cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg ggtgccta atgagtgaagcta
actcacatta	900	attgcgttgc gctcactgcc cgctttccag tcgggaaatc caagggc
947 <210>	7 <211>	1069 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
CmR gene <400>	7	gcaaaaatta aaaatgaagt tttaaataca tctaaagtat atatgagtaa
acttggctctg	60	acagttacca atgcttaatc agtgaggcac caataactgc cttaaaaaaa
ttacgccccg	120	ccctgccact catcgagta ctgttgta attcattaagca ttctgccgac
atggaagcca	180	tcacagacgg catgatgaac ctgaatcgcc agcggcatca gcacctgtc
gccttgcgta	240	taatatttgc ccatggtgaa aacgggggcg aagaagttgt ccatattggc
cacgttttaa	300	tcaaaactgg tgaaactcac ccagggattg gctgagacga aaaacatatt
ctcaataaac	360	cctttaggga aataggccag gttttcaccg taacacgcca catcttgcga
atatatgtgt	420	agaaactgcc ggaaatcgtc gtggtattca ctccagagcg atgaaaacgt
ttcagtttgc	480	tcatggaaaa cgggtgaaca aggggtgaaca ctatccata tcaccagctc
accgtctttc	540	attgccatac ggaatttcgg atgagcattc atcaggcggg caagaatgtg
aataaaggcc	600	ggataaaact tgtgcttatt tttctttacg gtcttttaaa aggccgta at
atccagctga	660	acggctctggt tataggtaca ttgagcaact gactgaaatg cctcaaaatg

ttctttacga 720 tgccattggg atatatcaac ggtggtatat ccagtgattt ttttctccat
 tttagcttcc 780 ttagctcctg aaaatctcga taactcaaaa aatagcccg gtagtgatct
 tatttcatta 840 tggtgaaagt tggaacctct tacgtgccga tcaacgtctc attttcgcca
 aaagtggcc 900 cagggttcc cggtatcaac agggacacca ggatttattt attctgcgaa
 gtgatcttcc 960 gtcacaggta tttattcggc gcaaagtgcg tcgggtgatg ctgccaaact
 actgatttag 1020 tgtatgatgg tgttttgag gtgctccagt ggcttctgtt tctatcagc
 1069 <210> 8 <211> 19 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 primer-pMOD<MCS>FP-1 <400> 8 attcaggctg cgcaactgt
 19 <210> 9 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 primer-pMOD<MCS>RP-1 <400> 9 tcagtgcg aggaagcgga ag
 22 <210> 10 <211> 28 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 primer-Tn5Ext <400> 10 agcatacatt atacgaagtt atattaag
 28 <210> 11 <211> 35 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 primer-Arb1 <400> 11 ttgagcgata gacgtacgat nnnnnnnnnn gatata
 35 <210> 12 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 primer-Arb2 <400> 12 ttgagcgata gacgtacgat
 20 <210> 13 <211> 25 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 primer-Tn5Int <400> 13 tcgacctgca ggcatgcaag cttca